

28 Rec'd PCT/STO

30 JUL 1991

PATENTTI- JA REKISTERIHALLITUS
THE NATIONAL BOARD OF PATENTS AND REGISTRATION

Helsinki

10.12.1990

PCT/FI/91/00044

FEB 26 1991

910133

Hakija
ApplicantCultor Oy
Helsinki

REC'D 23 JAN 1991

WIPO PCT

PRIORITY DOCUMENT

Patenttihakemus nro 900220
Patent application noTekemispäivä 15.01.1990
Filing dateKansainvälinen luokka C 12 P 7/02
Internätional classKeksinnön nimitys
Title of invention"Menetelmä ksylitolin ja etanolin valmistamiseksi
samanaikaisesti"

Täten todistetaan, että oheiset asiakirjat ovat tarkkoja jäljennöksiä patentti- ja rekisterihallitukselle alkuaan annetuista selityksestä, patenttivaatimuksista, tiivistelmästä ja piirustuksesta.

This is to certify that the annexed documents are true copies of description, claims, abstract and drawing, originally filed with the Finnish Patent Office.

Toimistos sihteeri


Marketta Huttunen

Leimavero 261,- mk



SECRET

Menetelmä ksylitolin ja etanolin valmistamiseksi samanaikaisesti

5 Keksintö koskee menetelmää ksylitolin ja etanolin valmistamiseksi samanaikaisesti. Lähtöaineena käytetään hydrolysoitua lignoselluloosapitoista materiaalia, ja menetelmän mukaisesti lähtöaine fermentoidaan hiivakannan avulla, minkä jälkeen etanoli otetaan talteen ja fermentoidulle liuokselle suoritetaan kromatografinen erotus
10 puhtaan ksylitolin saamiseksi.

 Ksylitoli on luonnossa esiintyvä sokerialkoholi, joka muodostuu ksyloosin pelkistysreaktiossa ja joka makeudeltaan ja kaloripitoisuudeltaan (4 kcal/g) vastaa "tavallista" sokeria. Ksylitoli esiintyy pieninä määrinä monissa hedelmissä ja vihanneksissa ja sitä muodostuu myös
15 ihmiskehossa normaalina aineenvaihduntatuotteena. Ksylitoli on tiettyjen aineenvaihdunnallisten, hammaslääketeellisten ja teknisten ominaisuuksiensa perusteella erittäin hyvä erikoismakeuttaja erilaisissa yhteyksissä. Esimerkkinä voidaan mainita, että ksylitoliaineenvaihdunta on riippumaton insuliiniaineenvaihdunnasta, joten myös diabeetikot voivat käyttää sitä. Ksylitoli vaikuttaa myös
20 hidastavasti suolen toimintaan, joten sillä voi olla käyttöä laihdutusdieeteissä. Lisäksi on haivaittu, että ksylitoli ei aiheuta hammasmätää, vaan sillä on jopa kariostaattinen vaikutus.

 Ksylitolin lukuisista eduista huolimatta sen käyttö on ollut melko rajoittunutta. Syynä tähän on ksylitolin suhteellisen korkea hinta, mikä taas johtuu vaikeuksista
30 tuottaa ksylitolia suuremmassa mittakaavassa.

 Etanoli on hyvin tunnettu yhdiste, jolla on laaja käyttö.

 Ksylitolia on aikaisemmin valmistettu ksylaani-
35 toisesta materiaalista hydrolysoimalla, jolloin saadaan monosakkaridiseos, jossa on mm. ksyloosia. Ksyloosi muutetaan sitten ksylitoliksi, yleensä nikkelikatalysaattorin,

kuten Raney-nikkelin läsnäollessa. Lukuisia menetelmiä ksyloosin ja/tai ksylitolin valmistamiseksi ksylaanipitoisesta materiaalista on kuvattu alan kirjallisuudessa. Esi-
merkkeinä voidaan mainita US-patenttijulkaisu 3 784 408
5 (Jaffe et al.), US-patenttijulkaisu 4 066 711 (Melaja et al.), US-patenttijulkaisu 4 075 406 (Melaja et al.), US-patenttijulkaisu 4 008 285 (Melaja et al.) ja US-patenttijulkaisu 3 586 537 (Steiner et al.).

Nämä tunnetut menetelmät ovat kaikki monivaiheisia, suhteellisen kalliita ja tehokkuudeltaan riittämättömiä
10 prosesseja. Suurimpina ongelmina ovat ksyloosin ja/tai ksylitolin tehokas ja täydellinen eristäminen polyoleista ja muista hydrolyysisivutuotteista ja prosessissa runsaasti syntyvien sivutuotteiden käyttö. Puhdistus on erittäin
15 vaativaa mm. sen takia, että ksyloosin pelkistysreaktiossa käytettävät katalyytit ovat hyvin herkkiä. Lopputuotteen puhtaus taas riippuu suuresti siitä, että ksylitoli saadaan erilleen muista pelkistysreaktiossa syntyneistä tuotteista.

On tunnettua, että useat hiivakannat tuottavat re-
duktaasientsyymejä, jotka katalysoivat sokerien pelkistä-
misen vastaaviksi sokerialkoholeiksi. Tiettyjen Candida-
kantojen on esitetty tuottavan ksylitolia ksyloosista (Ditzelmuller, G, et al.: FEMS Microbiology Letters 25
25 (1985) 195 - 198, Kitpreechavanich, M. et al.: Biotechnology Letters vol 6 (1984) 651 - 656, Gong, C-S. et al.: Biotechnology Letters vol 3 (1981) 125 - 130). Nämä tutkimukset on kuitenkin tehty vain laboratoriomittakaavassa, eikä alan kirjallisuudessa ole esitetty menetelmiä, joissa
30 kiteinen puhdas ksylitoli eristetään fermentaatiotuotteesta.

Hakijan rinnakkaishakemuksessa US 297 791, jätetty 17.1.1989, kuvataan menetelmä puhtaan kiteisen ksylitolin valmistamiseksi kasvimateriaalista käyttäen hydrolyysin ja
35 fermentoinnin jälkeen kromatografista erottamista. Tässä

menetelmässä kuitenkin suurin osa raaka-aineesta menetettään arvottomana jättemateriaalina. Mikäli suurempi osa raaka-aineista voitaisiin muuttaa kaupallisiksi tuotteiksi, tämä oleellisesti parantaisi kokonaismenetelmän taloudellisuutta.

Tiedetään, että etanolia voidaan valmistaa selluloosasta ja hemiselluloosasta fermentoimalla sopivan hiivakannan avulla. Etanolin valmistusta D-ksyloosista on kuvattu esimerkiksi US-patenttijulkaisussa 4 368 268 (C-S. Gong), joka erityisesti kohdistuu mutanttien aikaansaamiseen, jotka tuottavat etanolia suurin saannoin, ja julkaisussa Biotechnology and Bioengineering Symp. 12 (1982) 91 - 102, McCracken, L. & Gong, C-S., jossa fermentointi suoritetaan termotoleranttien hiivojen avulla.

Nyt on havaittu, että ksylitolia ja etanolia voidaan tuottaa samanaikaisesti käyttäen keksinnön mukaista menetelmää, jossa ksyloosi muutetaan ksylitoliksi, kun taas suurin osa raaka-aineessa olevista muista heksooseista muutetaan etanoliksi. Näin raaka-ainetta käytetään tehokkaasti hyödyksi, ja saadaan kahta kaupallisesti erittäin tärkeätä tuotetta puhtaina ja korkealla saannolla. Menetelmä on yksinkertainen ja tehokas.

Keksinnön mukaiselle menetelmälle on tunnusomaista, että hydrolysoitu lähtöaine fermentoidaan hiivakannan avulla, muodostunut etanoli otetaan talteen, jäljelle jääneelle ksylitoliliuokselle suoritetaan kromatografinen erotus ja puhdas ksylitoli kiteytetään. Lähtöaineena käytetään ksyloosipitoisia materiaaleja, jotka keksinnön mukaisesti fermentoidaan hiivakannan avulla, joka pystyy muuttamaan ksyloosin ksylitoliksi ja useimmat heksoosit etanoliksi. Fermentoinnin avulla saadaan runsaasti ksylitolia sisältävä liuos, josta ksylitoli otetaan talteen yksinkertaisella tavalla. Työläitä ja monimutkaisia erotusvaiheita (kuten perinteistä ioninvaihtoa, demineralisointia, saostuksia tms) ei tarvita, vaan yleensä ksylito-

li voidaan puhdistaa yhdessä vaiheessa kromatografisesti, minkä jälkeen se kiteytetään puhtaan ksylitolin saamiseksi. Etanoli on helppo poistaa fermentointiliuoksesta esimerkiksi haihduttamalla. Näin vältetään tarve erottaa ksylitoli heksitoleista ja muista sokereista, jotka ovat muodostuneet hydrolyysi- ja pelkistysvaiheissa. Keksinnön mukaisesti suoritettu hydrolyysi tarjoaa myös ratkaisun muissa menetelmissä jätemassana poistetun sulpun käytölle, joten keksinnön mukaisessa menetelmässä oleellisesti koko lähtömateriaali hyödynnetään.

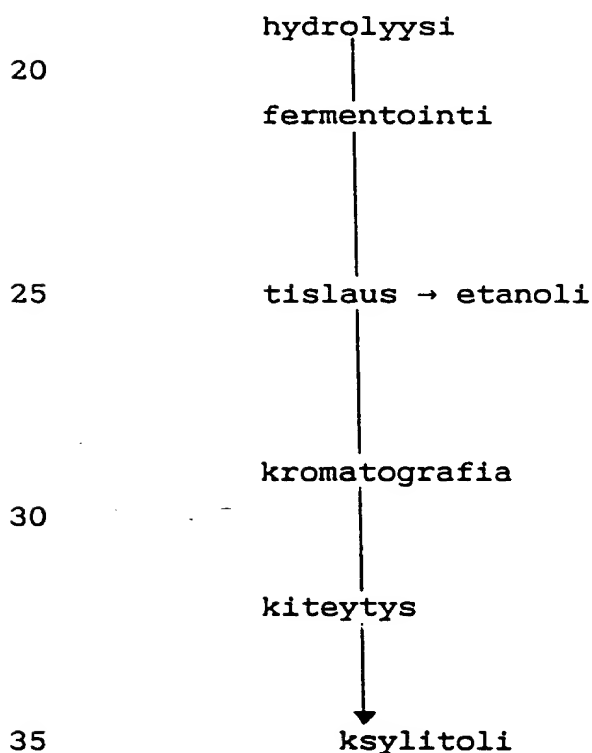
Lähtömateriaalina keksinnön mukaisessa menetelmässä voidaan käyttää melkein mitä tahansa ksylaaniptoista materiaalia. Mahdollisia lähtöaineita ovat mm. lehtipuut, kuten koivu, pyökki, poppeli, leppä ym. ja kasvit tai kasvien aineosat, kuten vehnän, maissin, kauran tai ohran oljet tai kuoriosat, maissintähkät ja -varret, pähkinäkuoret, sokeriruohon murskausjäte (bagassi) ja puuvilla-siementen kuoret. Käytettäessä puuta lähtömateriaalina, se edullisesti pienennetään tai käytetään hakkeena, sahapuru-
na ym. ja käsitellään hydrolysoimalla tai höyryräjäytysmenetelmällä ja jälkihydrolysoimalla, jolloin saadaan keksinnössä käyttökelpoista hiilihydraattimateriaalia.

Edellä mainittujen lisäksi voidaan käyttää esimerkiksi puumassan käsittely- ja valmistusprosesseissa muodostuneita runsaasti ksylaania tai ksyloosia sisältäviä sivutuotteita. Esimerkkinä mainittakoon puumassan valmistuksessa sulfiittiprosessin avulla syntyvä hapan sulfiittijäteliemi, joka sisältää pieniä määriä liukenemattomia puun kiintoaineita, sekä liukoisia aineita, kuten lignosulfonaatteja, heksooseja ja pentooseja, mukaan lukien ksyloosi, ja on hyvä raaka-aine käytettäväksi ksylitolin valmistuksessa. Paperin ja puumassan prosessoinnissa syntyneitä muita sivutuotteita ja jätetuotteita, kuten esimerkiksi esihydrolysaatteja viskoosimassan valmistuksesta ja ns. neutraalisulfiittiprosessin jäteliöntä, jotka sisältävät paljon ksylaania ja/tai ksyloosia voidaan myös käyttää.

Keksinnön mukaisessa menetelmässä käytetään vesi-
liuosta, joka sisältää vapaata ksyloosia. Näin ollen saat-
taa olla tarpeen suorittaa lähtömateriaalille happo- ja/
tai entsyymihydrolyysi ksylaenin hajottamiseksi ksyloosik-
si. Menetelmiä ksylaanipitoisten materiaalien hydrolysoi-
miseksi ksyloosipitoisten liuosten saamiseksi on kuvattu
esimerkiksi US-patenttijulkaisuissa 3 784 408 (Jaffe et
al.) ja 3 586 537 (Steiner et al.).

Lähtömateriaali voidaan haluttaessa esikäsitellä
ennen fermentointia sellaisten aineosien poistamiseksi,
jotka saattavat olla hiivalle myrkyllisiä tai muilla ta-
voin haitallisia. Esikäsittelevaiheen tarpeellisuus riip-
puu käytetystä lähtömateriaalista ja fermentoinnissa käy-
tetystä hiivasta. Lähtömateriaalin esikäsittelevaihe voi käsit-
tää esimerkiksi jälkihydrolyysin, kromatografisen erotuk-
sen, ioninvaihtopuhdistuksen, saostuksen tms.

Prosessikaavio on esitetty seuraavassa:



Hydrolyysi voi käsittää kaksi vaihetta, selluloo-
sapitoisen raaka-aineen esihydrolyysin, joka voidaan suo-
rittua käyttäen ns. höyryräjäytysmenetelmää, sekä poly- ja
oligosakkaridien entsymaattisen hydrolyysin vastaavien
5 monosakkaridien muodostamiseksi. Tämä vaihe suoritetaan
entsyymien avulla, joilla on korkea sellulolyttinen ja
ksylanolyttinen aktiivisuus.

Jäljelle jääneet kiinteät aineet, koostuen suurilta
osin ligniinistä, erotetaan sitten saadusta liuoksesta.
10 Vaihtoehtoisesti mainitut kiinteät aineet ja fermentoin-
nissa syntyvät kiinteät aineet, kuten hiiva, voidaan
erottaa tai ottaa talteen seuraavan tislauksen jälkeen.

Kun raaka-aineena käytetään suhteellisen epäpuhtai-
ta liuoksia, saattaa liuosten esikäsittely joissakin ta-
15 pauksissa olla tarpeen. Esikäsittely voi olla esimerkiksi
jälkihydrolyysi ja/tai aineosien erottaminen, jotka aine-
osat voivat olla käytetylle hiivalle myrkyllisiä ja/tai
haitallisia tai joilla on haitallinen vaikutus fermentoin-
tiin tai erotusvaiheisiin. Esikäsittelyyn voi myös liittyä
20 kromatografinen erotus, ioninvaihtopuhdistus, saostus tms.

Seuraavaksi liuos fermentoidaan sopivan hiivakannan
avulla. Keksinnössä käytetään hiivoja, jotka pystyvät pel-
kistämään ksyloosin ksyliitoliksi ja heksoosit etanoliksi
ja/tai käyttävät heksooseja kasvuun. Tällaisia hiivoja
25 ovat mm. Candida-, Pichia-, Pachysolen- ja Debaryomyces-
sukuihin kuuluvat hiivat. Edullisina pidetään Candida- ja
Debaryomyces -lajeja, erityisesti Candida tropicalis ja
Debaryomyces hansenii. Hyvänä esimerkkinä voidaan mainita
Candida tropicalis -kanta, joka on talletettu talletuslai-
30 tokseen the American Type Culture Collection numerolla
ATCC 9968.

Fermentoitavan vesiliuoksen ksyloosipitoisuus riip-
puu käytetystä lähtömateriaalista ja prosessivaiheista,
mutta on edullisesti noin 50 - 300 g/l.

35 Fermentointi voidaan suorittaa useimmissa kauppal-
lisesti saatavissa fermentoreissa, jotka on varustettu

ilmastusvälineillä ja sekoitus- ja pH-säätelyvälineillä. Lämpötila on edullisesti noin 20 - 40 °C, erityisen edullisesti noin 30 °C. Hiivasolut lisätään korkean ksyloosipitoisuuden liuokseen. Yleisesti voidaan sanoa, että mitä

5 suurempi on hiivakonsentraatio, sitä nopeampi on fermentointivaihe. On havaittu, että hiivakonsentraatio on edullisesti noin 1 - 20 g kuivaa hiivaa/l substraattia (kuivapainoa) kun ksyloosipitoisuus on noin 50 - 300 g/l.

Fermentointia voidaan tehostaa lisäämällä ravinteita ja sitä jatketaan kunnes suurin osa ksyloosista on

10 muutettu ksylitoliksi ja olennaisesti kaikki heksoosit on muutettu etanoliksi ja/tai käytetty hiivan kasvuun. Fermentointi kestää yleensä noin 24 - 144 tuntia, edullisesti 24 - 72 tuntia. Keksinnön mukaisella menetelmällä jopa 90

15 % ksyloosista voidaan muuttaa ksylitoliksi.

Fermentoinnin jälkeen liuos kirkastetaan ennen ksylitolin ja etanolin erottamista siitä. Hiivasolut poistetaan fermentoinnin jälkeen. Tämä voidaan suorittaa sentrifugoimalla, suodattamalla tai muulla samankaltaisella menetetyllä. Kun hiivasolut on poistettu ja liuos on kirkas

20 otetaan fermentoinnissa syntynyt etanoli talteen haihduttamalla, tislaamalla tai muulla samankaltaisella menetetyllä. Hiivasolujen poisto voidaan vaihtoehtoisesti suorittaa tislauksen jälkeen.

Ksylitolin talteenottamiseksi suoritetaan ensin kromatografinen erotus. Tämä tehdään edullisesti kolonnissa, joka on täytetty divinyylibentseenillä ristisidotulla sulfonoidulla polystyreenihartsilla alkali/maa-alkalimuodossa. Tarkoitukseen sopivaa suuren mittakaavan kromatografiamenetelmää on kuvattu US-patenttijulkaisussa

30 3 928 193 (Melaja et al.). Kromatografinen erotus voidaan suorittaa myös käyttäen simuloitua liikkuvaa petiä, kuten on kuvattu US-patenttijulkaisussa 2 985 589. Kolonnin täytteenä käytetään DVB-ristisidottua sulfonoitua polystyreenihartsia.

35

Kromatografiavaiheessa saadusta runsaasti ksylitolia sisältävästä fraktiosta ksylitoli voidaan kiteyttää hyvällä saannolla käyttäen tavanomaisia kiteytysmenetelmiä, kuten jäähdytys- tai haihdutuskiteytystä. Käytettäessä jäähdytyskiteytystä konsentroituun ksylitoliliuokseen lisätään siemenkiteiksi ksylitolikiteitä, joiden keskimääräinen läpimitta on noin 30 mikronia, minkä jälkeen liuoksen lämpötilaa alennetaan hitaasti. Saadut kiteet, joiden keskimääräinen läpimitta on noin 250 - 600 mikronia, erotetaan esimerkiksi sentrifugoimalla ja pestään vedellä oleellisesti puhtaan kiteisen ksylitolin saamiseksi.

Menetelmä voidaan vaihtoehtoisesti suorittaa siten, että lähtöaineelle suoritetaan osittainen hydrolyysi ja uutto. Uutosta saatu esihydrolysaatti fermentoidaan sitten ksyloosin muuttamiseksi ksylitoliksi, joka erotetaan kromatografisesti ja kiteytetään edellä kuvatulla tavalla. Uutetulle massalle suoritetaan loppuhydrolyysi, hydrolyysituote fermentoidaan heksoosien muuttamiseksi etanoliksi ja etanoli otetaan talteen edellä kuvatulla tavalla.

Keksintöä kuvataan yksityiskohtaisemmin seuraavien esimerkkien avulla, joiden tarkoituksena ei ole rajoittaa keksintöä.

Esimerkki 1

Etanolin ja ksylitolin valmistus koivulastuista

Koivulastuille suoritettiin höyryräjäytyskäsittely 215 °C:ssa viiveajalla 4,5 min. Käytetty laitteisto on kaupallisesti saatavissa (Stake Technology, Canada).

30 kg höyryräjäyttämällä esikäsiteltyjä lastuja suspendoitiin 400 l:aan vettä 50 °C:ssa sekoitusvälineillä varustetussa reaktorissa. Suspension pH säädettiin arvoon 4,8 NaOH-liuoksella. Seuraavat entsyymit lisättiin reaktoriin:

	Cellulase Multifect L 250 (Cultor)	4 FPU/g k.a.
5	beta-Glucosidase Novozyme 188 (Novo)	5 IU/g k.a.
10	Hemicellulase Multifect K, (Cultor) sisältäen	ksylanaasia 18 U/g ka B-ksylosidaasia 9 nkat/g ka esteraasia 2 nkat/g ka

15 Reaktio aloitettiin ja 3 ja 6 tunnin jälkeen seokseen lisättiin esikäsiteltyjä koivulastuja kiinteiden aineiden pitoisuuden nostamiseksi 14 paino-%:iin. Hydrolyysiä jatkettiin 3 vrk 50 °C:ssa ja pH-arvossa 4,8. Saanto hydrolyysin jälkeen oli 16 % glukoosia ja 12 % ksyloosia laskettuna esikäsiteltyjen lastujen kuivapainosta.

20 Liuos erotettiin kuiva-aineesta dekantointisentri-fuugissa (Sharples P 600). Hienojakoinen aine poistettiin Westfalia Na7-06-076 -separaattorissa ja ksyloosi-glukoo-siliuos konsentroitiin haihduttamalla. Konsentraatin pH oli 5,1 ja koostumus oli seuraava:

25	glukoosi	10,3 %
	ksyloosi	7,6 %
	muuta monosakkarideja	3,1 %
	oligosakkarideja	5,5 %

Kiinteiden aineiden kokonaismäärä oli noin 32 %.

30 Liuos sisälsi lisäksi orgaanisten happojen suoloja ja pieniä määriä ligniinin hajoamistuotteita, furfuraalia, fenoleja ja muita orgaanisia aineita.

35 Hydrolysoitu tuote fermentoitiin hiivalla Candida tropicalis ATCC 9968. Fermenttorina käytettiin New Brunswick Scientific Co If 250 -fermenttoria johon oli liitetty kaasuanalyysi- ja massaspektrometrilaitteistot.

Fermentointiliuoksessa oli:

60 l	esihydrolysaattia (kuiva-ainepitoisuus noin 32 %)
5	
1,5 kg	Gistex-hiivauutetta (höyrysteriloitu 121 °C, 15 min)
29 l	vettä

10

Siirrostopviljelmät kasvatettiin kahdessa vaiheessa, ensin 2 l erlenmeyerpulloissa Orbital Shaker -ravistelijassa 30 °C:ssa, 2 vrk ja sitten Microgen SF 116 -laboratoriofermenttorissa, jonka käyttötilavuus oli 11 l. Fermenttoria ilmastettiin nopeudella 5,5 Nl/min (0,5 VVM) ja sekoitettiin nopeudella 500 RPM. Kasvatus kesti 1 vrk.

Varsinainen fermentointisuoritettiin pilot -mittakaavassa käyttötilavuuden ollessa 100 l. Fermenttoria ilmastettiin nopeudella 20 Nl/min (0,2 VVM) ja sekoitettiin nopeudella 100 rpm. Lämpötila pidettiin 30 °C:ssa ja pH-arvo 6:ssa. Vaahtoamisen säätelyaineena käytettiin Plurioria®.

20

Fermentointitulokset on esitetty taulukossa 1.

Taulukko 1

aika (h)	hiiva (g/kg)	ksylitolili (g/l)	glukoosi (g/l)	etanoli (g/l)
0	2,0	0,0	53,5	1,9
16	6,1	2,9	2,4	26,4
23,5		4,7		26,7
41,0	7,4	9,0	1,9	25,6
65,0	8,0	15,8		24,9
91,5	6,1	21,2		23,4
136		20,6		22,3

Fermentoinnin jälkeen oleellisesti kaikki sokerit olivat muuttuneet ksylitoliksi tai etanoliksi.

5 Etanoli otettiin talteen liuoksesta tislaamalla fermentoitu liuos tavanomaisella tavalla. Tislauslaitteisto koottiin vakiorakenneosista (Corning Process Systems), jotka olivat borosilikaattilasiasia ja laitteisto käsitti välineet 15 erotusvaihetta varten seuraavasti: kiehutin, 13 kellopohjaa ja syöttöpohja 4. ja 5. kellopohjan välissä ylhäältä lukien. Kolonnin halkaisija oli 10 cm.

10 Tislaus suoritettiin paineessa 110 mbar syöttönopeudella 10 l/h ja palautussuhteella 3:1. 110 l:sta fermentointiliuosta saatiin 7,0 kg tislettä, joka sisälsi 27,1 paino-% etanolia. Pohjatuotteen etanolipitoisuus oli 0,02 paino-%.

15 Ksylitolin erotus ja kiteytys tapahtui esimerkeissä 2 ja 3 kuvatulla tavalla.

Esimerkki 2

20 Etanolin ja ksylitolin valmistus sulfiittijäteliemestä

Lähtöaineena käytettiin sulfiittijäteliemestä kromatografisesti erotettua sokerijaetta (FI 862273, US 4 631 129), joka sisälsi huomattavan määrän heksooseja, pääasiassa glukoosia. Liuoksen koostumus ennen fermentointia ja sen jälkeen on esitetty taulukossa 2.

Taulukko 2

	<u>aineosa</u>	<u>ennen fermentointia</u>	<u>fermentoinnin jälkeen</u>
30	kuiva-aine paino-%	19,0	-
	oligosakk. % k.a.	14,8	10,3
	glukoosi	90,0	1,4
	ksyloosi	42,0	3,5
	arabinoosi	5,0	2,3
35	ksylitoli	-	25,4
	etanoli	-	42,0
	arabinitoli	-	2,8

5 Fermentointi suoritettiin *Debaryomyces hansenii* -
kannalla ja väliaineeseen lisättiin 3 g/l hiivauutetta, 3
g/l mallasuutetta ja 5 g/l peptonia. Fermentoitavan liu-
oksen pH oli alussa noin 6,0, lämpötila oli noin 30 °C ja
fermentointi suoritettiin Orbital Shaker -ravistelijassa
(200 rpm).

10 Fermentoinnissa syntynyt etanoli otettiin talteen
tislamaalla (50 °C, 200 mbar) ja jäljelle jääneelle liu-
okselle suoritettiin kromatografinen erotus divinyylibent-
seeni-ristisidotulla polystyreenirunkoisella kationinvaih-
tajalla täytetyssä kolonnissa, jolloin käytettiin seuraa-
via olosuhteita:

	kolonnin korkeus	4,0	m
	kolonnin läpimitta	22,5	cm
15	lämpötila	65	°C
	virtausnopeus (H ₂ O)	30	l/h
	syöttöpitoisuus	30	paino-%
	syöttökoko	6	kg kuiva-ainetta
	hartsi: Finex C 09		
20	palloskoko	0,37	mm
	ionimuoto	Na ⁺	

25 Tulokset on esitetty graafisesti kuviossa. Ksylito-
li erotettiin ksyloosista ja muista epäpuhtauksista ja
otettiin talteen korkean ksylitolipitoisuuden omaavasta
fraktiosta, josta puhdas ksylitoli kiteytettiin esimerkis-
sä 3 kuvatulla tavalla.

Esimerkki 3

30 Ksylitolin kiteytys

Kromatografisesti rikastetusta ksylitoliliuoksesta,
joka sisälsi 82,5 % ksylitolia kuiva-aineesta, ksylitoli
kiteytettiin haihduttamalla liuos 92 p-% kuiva-ainetta
sisältäväksi 65 °C:ssa. Liuokseen, jota oli 2 200 g luon-
nonpainoa, ympättiin 0,03 p-% kuiva-aineesta noin 0,04 mm
35

kokoisia ksylitolikiteitä, ja liuos jäähdytettiin 55 tunnissa 45 °C:een seuraavan empiirisen yhtälön mukaisesti:

$$T = T_1 - (t/t_1)^{**2} * (T_1 - T_2), \text{ missä}$$

- 5 T = liuoksen lämpötila, °C
 T₁ = siemennyslämpötila (65 °C)
 T₂ = loppulämpötila (45 °C)
 t = aika siemennyksestä, h
 t₁ = kiteytysaika (55 h)

10

Kiteytys suoritettiin vertikaalisella sekoittajalla varustetussa 2 litran pilot -kiteyttimessä. Liuoksessa olevasta ksylitolista kiteytyi 65 % raakakiteinä, jotka erotettiin emäliuoksesta korisentrifugilla (Hettich, Roto Silenta II).

15

Linkouksen aikana kiteitä pestiin vedellä (4 % vet-
 tä kiteiden painosta). Linkousaika oli 5 min ja käytettiin
 2 000 g:n keskipakovoimaa. Kidesuspensiota lingottiin
 1 510 g luonnonpainoa, mistä saatiin 705 g kuiva-ainetta
 20 kidettä, jonka ksylitolipitoisuus oli 99,4 % kuiva-aines-
 ta. Kiteiden keskikoko oli 0,37 mm ja standardipoikkeama
 24 %.

Raakakiteet voidaan uudelleenkiteyttää tuotekiteik-
 si FI-patenttijulkaisussa 69296 esitetyllä tavalla.

25

Esimerkki 4

Etanolin ja ksylitolin valmistus ohrankuorista

Lähtöaineena käytettiin ohrankuorimassaa, jonka
 hiilihydraattikoostumus oli seuraava:

30	ksylaani	21,6 % k.a.
	glukaani	33,4
	arabinaani	5,7
	galaktaani	1,4
	mannaani	0,6
35	ramnaani	0,2

Ohrankuorimassa hydrolysoitiin paineessa 350 psi 235° C:ssa ja viiveaika oli 2,0 min. Hydrolysoitu materiaali sisälsi 46,6 % kuiva-ainetta ja liuenneiden kiinteiden aineiden pitoisuus oli 34,2 % kuiva-aineesta. Suodos sisälsi kuiva-aineesta laskettuna monosakkarideja 12,7 %, etikkahappoa 16,9 % ja furfuraalia 0,5 %. Suodokselle suoritettiin jälkihydrolyysi säätämällä pH arvoon 1 rikkihapolla ja hydrolysoimalla liuosta 4 h yhden ilmakehän paineessa 100 °C:ssa. Jälkihydrolysaatin koostumus oli seuraava:

oligosakkarideja	1,3 % k.a.		
monosakkarideja	45,2 %	- ksyloosi	67,3 % monosak-
		- arabinoosi	11,4 % kari-
		- glukoosi	16,0 % deista
		- galaktoosi	3,3 %
		- mannoosi	1,5 %
		- ramnoosi	0,5 %
muita	3,3 % k.a.		
(mm. furfuraalia)			

Jälkihydrolysaatin fermentointi, etanolin talteenotto ja ksylitolin kiteytys tapahtui edellisissä esimerkeissä kuvatulla tavalla.

25 Esimerkki 5

Etanolin ja ksylitolin valmistus kaurankuorista

Lähtöaineena käytettiin kaurankuorimassaa, jonka hiilihydraattikoosumus oli seuraava:

ksylaani	26,5 % k.a.
glukaani	30,7 %
arabinaani	3,0 %
galaktaani	1,3 %
mannaani	0,2 %

Kaurankuorimassa hydrolysoitiin paineessa 350 psi 235° C:ssa ja viiveaika oli 2,0 min. Hydrolysoitu materiaali sisälsi 39,1 % kuiva-ainetta ja liuenneiden kiinteiden aineiden pitoisuus oli 36,4 % kuiva-aineesta. Suodos sisälsi kuiva-aineesta laskettuna monosakkarideja 12,0 %, etikkahappoa 12,9 % ja furfuraalia 0,5 %. Suodokselle suoritettiin jälkihydrolyysi säätämällä pH arvoon 1 rikkihapolla ja hydrolysoimalla liuosta 4 h yhden ilmakehän paineessa 100 °C:ssa. Jälkihydrolysaatin koostumus oli seuraava:

oligosakkarideja	1,3 % k.a.		
monosakkarideja	63,1 %	- ksyloosi	69,0 % monosak-
		- arabinoosi	6,9 % kari-
		- glukooosi	19,1 % deista
		- galaktoosi	3,1 %
		- mannoosi	0,8 %
		- ramnoosi	1,1 %
muita	2,8 % k.a.		
(mm. furfuraalia)			

Jälkihydrolysaatin fermentointi, etanolin talteenotto ja ksylitolin kiteytys tapahtui edellisissä esimerkeissä kuvatulla tavalla.

25 Esimerkki 6

Koivulastujen höyryräjäytys ja uutto

Koivulastuille suoritettiin höyryräjäytyskäsittely tehdasmittakaavaisella laitteistolla lämpötilassa 215 °C viiveajalla 4,5 min. Käytetyn laitteiston valmistaja on Technip, laitetyyppi StakeII system.

Höyryräjäytystuote lietettiin kuumaan prosessivee-
teen sekoitussäiliössä n. 3,5 % kuitususpensioksi. Sieltä liete ohjattiin ylijouksun kautta tasaiseksi kerrokseksi vastavirtaperiaatteella toimivalle 5-vaiheiselle nauhasuo-
timelle (tyyppi A 40-B25; valmistaja Filters Philippe;

kangasviiran leveys oli 2,7 m, viira oli laitteen valmistajan toimittama). Viiralla kiinteää massaa uutettiin edelleen kuumalla vedellä.

Saadussa vesiliuoksessa oli:

5	kuiva-ainepitoisuus	8,7	paino-%
	ksyloosimonomeereja	1,1	% luonnonpainosta
	ksyloosioligomeereja	3,7	% "
	glukoosia	0,04	% "

10 Esimerkki 7

Höyryräjytetyn vesipestyn koivulastumassan entsyymaattinen hajottaminen

Hydrolyysin raaka-aineena käytetyn höyryräjytetyn (215 °C/4,5 min) koivulastumassan (valmistettu esimerkin 6 mukaisesti) koostumus oli seuraava:

15	kuiva-ainetta	32	%
	selluloosaa	60	% k.a.:sta
	ksylaania	3,6	% "
	ligniiniä	25	% "
20	(asetoniin uuttuva)		
	Klason ligniini	12,3	% "

Edellä kuvattua massaa punnittiin 90 kg sekoittajalla ja lämmitysvaipalla varustettuun reaktiosäiliöön, jossa oli 370 litraa vettä. Seos lämmitettiin 50 °C:een, pH säädettiin arvoon 4,8 - 5,0, minkä jälkeen lisättiin entsyymiliuokset (1,24 l Multifect L 250, 0,11 l Novozyme 188 ja 0,09 l Multifect K). Lisäysmäärät vastaavat aktiivisuusyksikköinä sellulaasia 6 FPU/g, β -glukosidaasia 5 IU/g ja hemisellulaasia (ksylanaasia 18 U/G k.a., β -ksylosidaasia 9 nkat/g k.a., esteraasia 2 nkat/g k.a.) 0,02 ml kasvuliuosta/g massan kuiva-ainetta. Reaktion annettiin jatkua edellä kuvatuissa olosuhteissa 18 tunnin ajan. Tällöin lisättiin massaa ja entsyymejä samat määrät kuin aloitusvaiheessa. Vastaava massan ja entsyymien lisäys

toistettiin 21 tunnin kuluttua aloituksesta. Tämän jälkeen hydrolyysireaktion annettiin jatkua niin että kokonaisaika oli 40 tuntia. Entsyymien toiminta pysäytettiin tällöin lämmittämällä massaseos 80 °C:een 10 - 20 minuutin ajaksi.

5 Samalla myös jäljelle jäänyt kiintoaines kiinteytyy ja on helpommin erotettavissa. Kiintoaine ja liuos erotettiin toisistaan sentrifugoimalla (Pennval Sharples P 600 -malli). Liuos kirkastettiin vielä erottamalla jäljelle jäänyt hieno sakka separaattorilla (Westfalia malli NA7-06-076).

10 Liuos konsentroitiin 33 %:iin fermentointia varten haihduttamalla Luwa -haihduttajalla vakuumissa 40 - 50 °C:een lämpötilassa.

Höyryräjäytetyn vesipestyn koivulastumassan hydrolyysisaannot entsyymikäsittelyssä:

15	% liuoksessa	saanto % k.a:sta	konversio %
	glukoosi 3,3	24,5	40,8
	ksyloosi 0,4	2,6	72,0
	oligosakkaridit 0,7		

20 Kirkastetun ja haihdutetun entsyymihydrolysaattiliuoksen koostumus:

glukoosia	22,7 %	luonnonpainosta
ksyloosia	2,7 %	"
oligosakkaridit	4,7 %	"

25

Esimerkki 8

Höyryräjäytetyn vesipestyn koivulastumassan entsyymaattisen hydrolysaatin fermentointi etanoliksi

Hydrolysoitu selluloosa fermentoitiin hiivalla

30 Candida tropicalis ATCC 9968. Fermenttorina käytettiin New Brunswick Scientific IF-250 -fermenttoria.

Fermentointiliuoksessa oli:

45	1	hydrolysaattia
1,5	kg	Gistex-hiivauutetta
35	40	1 vettä

Siirrostopviljelmät kasvatettiin kahdessa vaiheessa, ensin 2 l erlenmeyerpulloissa Orbital Shaker -ravitelijassa 30 °C:ssa 2 vrk, sitten New Brunswick Scientific SF-116 -laboratoriofermenttorissa, jonka käyttötilavuus oli 11 l. Fermenttoria ilmastettiin 5,5 Nl/min (0,5 vvm) ja sekoitettiin nopeudella 500 rpm. Kasvatus kesti 1 vrk.

Varsinainen fermentointi tehtiin pilot -mitta-kaavassa käyttötilavuuden ollessa 100 l. Fermenttoria ilmastettiin 25 Nl/min (0,25 vvm) ja sekoitettiin nopeudella 100 rpm. Lämpötila säädettiin 30 °C:een ja vaahtoamista kontrolloitiin Pluriol -vaahdonestoaineella.

Fermentoinnin tulokset on esitetty taulukossa 4.

15 Taulukko 4

aika (h)	solumassa (g/l)	glukoosi (g/l)	etanoli (g/l)
0	1,8	105,0	1,9
19,5	11,3	0	51,2
20 52	-	0	48,1
66	-	0	45,0

Hiiva kulutti 29,5 h aikana kaiken alustassa olevan glukoosin tehden siitä etanolia 48 % saannolla.

25 Fermentoinnin jälkeen hiivasolut erotettiin liuoksesta sentrifugoimalla (Westfalia NA7-06-076). Kirkastettu liuos tislattiin etanolin talteenottoa varten.

Esimerkki 9

30 Etanolin talteenotto höyryräjätetyn, vesipestyn koivulastumassan entsymaattisen hydrolysaatin fermentointituotteesta

35 Tislattavana oli 100 litraa fermentoitua selluloosa-
sahydrolysaattia. Fermentointi oli tehty esimerkissä 8
kuvatulla tavalla ja kirkastettu sentrifugoimalla Westfa-

lia NA7-06-076 -separaattorilla. Liuoksen etanolipitoisuus oli 3,4 %.

5 Tislauslaitteisto oli koottu Corning Process Systemsin vakiorakenneosista, jotka olivat borosilikaattilasia. Kolonnin halkaisija oli 10 cm. Laitteistossa oli 15 erotusvaihetta: kiehutin, 13 kellopohjaa ja syöttöpohja 4. ja 5. kellopohjan välissä ylhäältä lukien. Tislaus tehtiin paineessa 100 mbar, syöttönopeudella 10 l/h ja palautussuhteella 3:1. Talteen saatiin 8,5 kg tislettä, 10 jonka etanolipitoisuus oli 36,0 %. Pohjatuotteen etanolipitoisuus oli 0,1 %.

Patenttivaatimukset

5 1. Menetelmä ksylitolin ja etanolin valmistamiseksi samanaikaisesti hydrolysoidusta lignoselluloosapitoisesta materiaalista, t u n n e t t u siitä, että lähtöaine fermentoidaan hiivakannan avulla, muodostunut etanoli otetaan talteen, jäljelle jääneelle ksylitoliliuokselle suoritetaan kromatografinen erotus ja puhdas ksylitoli kiteytetään.

10 2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että lähtöaine uutetaan, uutettu liuos fermentoidaan ksyloosin muuttamiseksi ksylitoliksi ja ksylitoliliuokselle suoritetaan kromatografinen erotus ja kiteytys ja uutetulle massalle suoritetaan loppuhydro-
15 lyysi, se fermentoidaan ja muodostunut etanoli otetaan talteen.

20 3. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että lähtöaineena käytetään ksy- laania sisältävää lignoselluloosaa, kuten koivua tai viljankuorta.

4. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että lähtöaineena käytetään sul- fiittijätelientä.

25 5. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että hiivakanta pystyy muuttamaan vapaan ksyloosin ksylitoliksi ja läsnäolevat vapaat hek- soosit etanoliksi.

30 6. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että hiivakanta kuuluu Candida- tai Debaryomyces -sukuun.

7. Patenttivaatimuksen 1 tai 6 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että hiiva on Candida tropicalis -laji, ja on edullisesti Candida tropicalis ATCC 9968.

35 8. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että hiiva on Debaryomyces hanse- nii -laji.

9. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä,
t u n n e t t u siitä, että etanoli otetaan talteen tisl-
laamalla.

5 10. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä,
t u n n e t t u siitä, että hydrolyysi suoritetaan höy-
ryräjäytyksellä ja entsyymaattisella loppuhydrolyysillä.

10 11. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä,
t u n n e t t u siitä, että kromatografinen erotus teh-
dään käyttäen stationäärisenä faasina vahvaa kationin-
vaihtohartsia.

12. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä,
t u n n e t t u siitä, että fermentointi suoritetaan pH-
arvossa noin 4 - 7, edullisesti noin 5,7 ja lämpötilassa
noin 10 - 45 °C, edullisesti noin 25 - 35 °C.

15 13. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä,
t u n n e t t u siitä, että uutetun massan loppuhydro-
lyysi tehdään entsyymaattisesti.

(57) Tiivistelmä

Keksintö koskee menetelmää ksylitolin ja etanolin valmistamiseksi samanaikaisesti hydrolysoidusta lignoselluloosapitoisesta materiaalista, jolloin lähtöaine fermentoidaan hiivakannan avulla, muodostunut etanoli otetaan talteen, jäljelle jääneelle ksylitoliliuokselle suoritetaan kromatografinen erotus ja puhdas ksylitoli kiteytetään.

(57) Sammandrag

Uppfinningen avser ett förfarande för samtidig framställning av xylitol och etanol från ett hydrolyserat lignocellulosahaltigt material, varvid utgångsmaterialet fermenteras med en jäststam, etanolen som bildats tillvaratas, den resterande xyli-
tollösningen separeras kromatografiskt och ren xylitol kristalliseras.

KROMATOGRAFINEN EROTUS

